



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
DE MADRID**

TRABAJO FIN DE GRADO

**“INNOVACIÓN EN TECNOLOGÍA
FARMACÉUTICA DE INTERÉS TERAPÉUTICO:
Aplicación de antagonistas opiáceos en cáncer”**

Autor: Érika Vanessa Castañeda Flores

Tutor: Maria Esther Gil Alegre

Convocatoria: Febrero 2017

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN	
2.1 Definición y etilogía del cáncer.....	3
2.2 Epidemiología y factores de riesgo.....	5
2.3 Tratamientos y cuidados paliativos.....	6
2.4 Manejo terapéutico del dolor oncológico.....	6
2.5 La morfina	8
3. ANTECEDENTES.....	9
4. OBJETIVOS.....	11
5. MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1 Sustancias	11
5.2 Línea celular y condiciones de cultivo.....	11
5.3 Ensayo de MTT.....	14
5.4 Análisis estadístico.....	16
6. RESULTADOS.....	16
7. DISCUSION.....	18
8. CONCLUSIONES.....	18
9. BIBLIOGRAFÍA.....	19

1. RESUMEN

La morfina es ampliamente utilizada para tratar el dolor severo y crónico (dolor oncológico). Estudios recientes relacionan el uso de morfina con la proliferación de células tumorales.

El objetivo principal del presente trabajo es realizar las tareas necesarias, mediante revisión bibliográfica y trabajo de investigación, para evaluar un sistema que revierta estos efectos adversos de la morfina en el tratamiento del dolor en pacientes con cáncer. Para ello se investigará el efecto de un antagonista opioide: naloxona. En caso de encontrar resultados positivos (reversión del efecto proliferativo celular de la morfina) se propone, como innovación tecnológica de interés terapéutico, el uso de naloxona incluida en un sistema de liberación modificada (micropartículas poliméricas), dadas sus características biofarmacéuticas y farmacocinéticas (baja biodisponibilidad por vía oral y corta semivida plasmática).

Para evaluar los efectos de la morfina en la proliferación celular y la reversión debida a naloxona será necesario adquirir conocimientos referentes al cultivo celular (tanto teóricos como prácticos), así como del uso de los equipos de medida de absorbancia.

Nuestros resultados aportan novedades en cuanto a la generación de un modelo sistemático experimental que nos permite entender el comportamiento dosis-dependiente de la morfina y la utilidad de naloxona para revertir su efecto adverso. Esto ha sido esencial para poder evaluar, en un trabajo futuro, el sistema de liberación modificada, micropartículas, con naloxona, las cuales podrían ser insertadas aprovechando la extirpación quirúrgica del tumor y/o inyectadas.

En conclusión, el presente trabajo ha resultado de utilidad para aunar los conocimientos adquiridos a lo largo del Grado en Farmacia, para desarrollar destrezas en el campo de la búsqueda y organización de información científica y, por último, para aprender a trabajar en un equipo de investigación.

2. INTRODUCCIÓN

El cáncer es y debe ser entendido como un problema prioritario de salud pública, ya que constituye la principal causa de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. En términos absolutos, se sitúa como la primera causa de muerte en España (un 45 % de los casos de muerte en 2000); la primera en varones y la segunda en mujeres [1].

2.1. Definición y etiología del cáncer

El término “Cáncer” designa un grupo de enfermedades caracterizadas por crecimiento excesivo y descontrolado de células, pudiendo afectar a cualquier parte del organismo ya que invaden y dañan tejidos y órganos; provocando finalmente la muerte de individuo. El cáncer

se desarrolla a partir de una célula normal. Son dos los procesos sucesivos que han de llevarse a cabo para que una célula normal se transforme en célula tumoral. Por un lado se produce el incremento de la proliferación de un grupo determinado de células; sin embargo, dichas células pueden desarrollar capacidad invasiva, lo que les permite migrar hacia otros tejidos u órganos a través del torrente circulatorio sanguíneo y proliferar, este segundo proceso es conocido como metástasis (Figura 1).

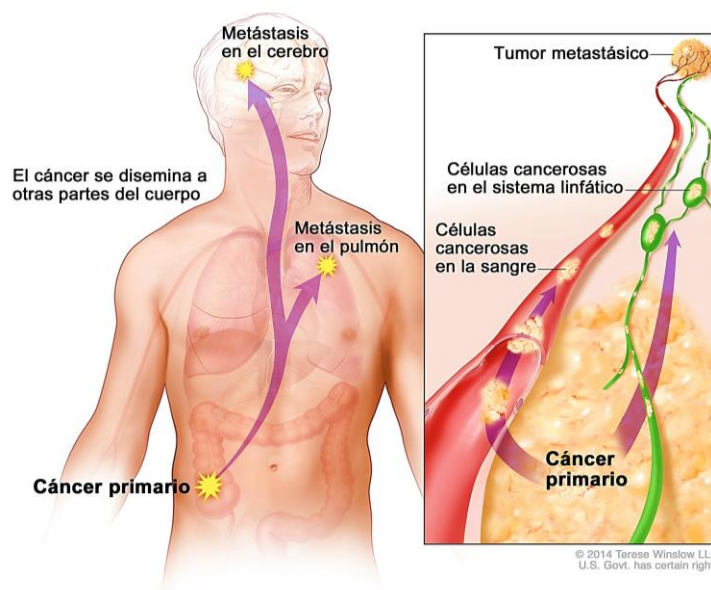


Figura 1. Proceso de metástasis

La proliferación excesiva de células, antes mencionada, es el resultado de una mutación inicial en un gen (Tabla 1). Los protooncogenes son genes normales que regulan el crecimiento celular: codifican factores de crecimiento, factores de transcripción y proteínas de señalización, los cuales a su vez estimulan la expresión de genes requeridos para proliferación celular. Cuando se producen formas mutadas de estos genes, llamados oncogenes, es cuando se originan proteínas con la función alterada; favoreciéndose así, la invasión celular.

Tabla 1. Genes cuya alteración causa la aparición de cáncer

GENES IMPLICADOS EN LA APARICIÓN DEL CÁNCER			
Nombre	Número aprox.	Mutados en tumores humanos	Mecanismo de oncogenicidad
Proto-oncogenes	100	30	cambio de función
Genes supresores de tumores	30	15	pérdida de función
Genes de reparación del DNA	25-35?	>6?	pérdida de función

Fuente: Muñoz, A. Cáncer: genes y nuevas terapias (1997).

Por el contrario, los genes supresores de tumores inhiben el crecimiento celular, y su inactivación inadecuada es la que acelera la proliferación de células. También es importante mencionar que cuando los genes reparadores de DNA fallan, las células no pueden autorepararse. Esta alteración hace que los genes apoptóticos induzcan la apoptosis de dichas células, pero si éstos no funcionan correctamente acaban subsistiendo células dañadas y en definitiva se fomenta el desarrollo del cáncer [2].

2.2. Epidemiología y factores de riesgo

Según los datos de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), la incidencia de cáncer aumenta en personas de edad avanzada (la predicción para 2015 fue de 227.076 casos) [3]. Esto se debe a la acumulación de factores de riesgo y además a la pérdida de eficacia de los mecanismos de reparación celular, que se pueden producir con la edad. También esta incidencia suele ser mayor en hombres que en mujeres (Tabla 2).

Tabla 2. Incidencia de cáncer en España por edades en 2012 y 2015

Año	Número estimado de nuevos casos	Hombre	Mujer	Ambos sexos
2012		128550	86984	215534
	< 65 años	46202	39225	85427
	> = 65 años	82348	47759	130107
2015		135954	91122	227076
	< 65 años	48555	40487	89042
	> = 65 años	87399	50635	138034
	Cambio demográfico	7404	4138	11542
	< 65 años	2353	1262	3615
	> = 65 años	5051	2876	7927

Fuente: Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC

Los datos publicados en el último informe de GLOBOCAN 2012 [4], indican que los tipos de cáncer más frecuentemente diagnosticados en España fueron el de pulmón, próstata, colorrectal, estómago e hígado, en el caso de los hombres; y los de mama, colorrectal, pulmón y cuello uterino, en el caso de las mujeres (Tabla 3).

Una dieta desequilibrada, el sedentarismo y el elevado consumo de alcohol y tabaco son los principales factores de riesgo de cáncer en todo el mundo. Además se observado que infecciones crónicas, producidas por virus de las hepatitis B y C, o por el VIH; aumentan el riesgo de cáncer de hígado y de cuello uterino, respectivamente. De todos estos factores, el tabaco es el más importante, ya que causa más del 20% de las muertes mundiales por cáncer en general, y alrededor del 70% de las muertes mundiales por cáncer de pulmón. Se prevé que los casos anuales de cáncer aumentarán a 22 millones en las próximas dos décadas [5].

Tabla 3. Localizaciones de cáncer más frecuentes en España en 2012

	Hombre	Mujer	Ambos Sexos
1º	Próstata	Mama	Colorrectal
2º	Pulmón	Colorrectal	Próstata
3º	Colorrectal	Cuerpo de Útero	Pulmón
4º	Vejiga	Pulmón	Mama
5º	Estómago	Ovario	Vejiga

Fuente: Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC

2.3. Tratamientos y cuidados paliativos

Los profesionales sanitarios deben plantearse siempre en un primer momento restablecer la salud perdida del paciente. Un paso previo esencial para un tratamiento adecuado y eficaz, y por lo tanto, un pronóstico favorable; es el diagnóstico correcto del cáncer. Cada tipo de cáncer necesita un tratamiento específico que incluye: la cirugía, la radioterapia y/o quimioterapia. Si detectamos de forma precoz y tratamos adecuadamente el cáncer, incrementaremos la tasa de curación.

En los últimos años, se ha avanzado mucho en lo que se refiere a tratamientos específicos para el cáncer gracias a las investigaciones, sin embargo, los datos de incidencia y muerte siguen siendo impactantes, no llegando a mejorar la supervivencia del paciente de forma significativa. A pesar de que el objetivo principal del cáncer es la prevención o curación, otro objetivo importante es prolongar y mejorar la calidad de vida del paciente.

Los tratamientos paliativos no tienen la finalidad de curar, sino aliviar los síntomas, ayudando así a mejorar la calidad de vida del paciente, y debe ser una necesidad humana de primer orden. Tanto el tratamiento curativo como el paliativo deben ser concepciones complementarias y en ningún momento excluyentes [6,7].

2.4. Manejo terapéutico del dolor oncológico

El dolor según la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) se define como: “una experiencia sensorial y emocional desagradable que se relaciona con un daño tisular real o potencial, o que se describe en términos de ese daño” [8]. Cuando el dolor tiene una duración superior a tres meses y se asocia con cambios importantes en el estado psicológico, social y funcional del paciente, se habla de “dolor crónico”. Así, el dolor crónico

maligno es el que se produce en enfermedades potencialmente terminales para la vida del individuo, como ejemplo típico tenemos en dolor oncológico, también llamado dolor neoplásico.

En el año 1984, los expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), al considerar el dolor un problema de salud pública, dieron una serie de directrices basadas en evidencias, para el manejo del dolor; en ellos se expone que el tratamiento debe seguir unas pautas posológicas establecidas y que se debe evitar la toma a demanda y los placebos [9]. En los años posteriores, han surgido múltiples revisiones y guías médicas, en las cuales se observan aspectos comunes:

- El dolor, es un síntoma que con frecuencia aparece en pacientes con cáncer, y se asocia a su estadio. En el momento del diagnóstico lo padece ya el 37% de los pacientes, en fases iniciales sobre un 48% y en fases avanzadas en el 74%. Aunque la causa principal del dolor oncológico es la progresión del proceso tumoral, alrededor de una quinta parte de los dolores que padecen dichos pacientes, tiende a asociarse al tratamiento oncoespecífico ya sea cirugía, quimioterapia o radioterapia. Otras causas son menos frecuentes pero también deben ser consideradas [6].
- A pesar de las diferentes alternativas terapéuticas en más del 50% de los casos no se consigue un control aceptable. El 25%-30% de los pacientes experimentarán un constante sufrimiento hasta su fallecimiento. [10]

El método efectivo y sencillo, antes mencionado, que fue diseñado por la OMS, es conocido como la “escalera analgésica”. Esta consiste en emplear analgésicos en función de la intensidad del dolor: a medida que el dolor aumenta, se aumenta también la potencia del analgésico (la vía oral es de primera elección, dejando otras como alternativa).

La escalera analgésica incluye tres escalones terapéuticos: “en el **primer escalón** se usa un AINE y cuando éste no controle el dolor se añade un opiáceo débil (**segundo escalón**). Cuando esta combinación deja de ser efectiva el opiáceo débil es remplazado por uno potente como la morfina (**tercer escalón**), manteniendo el tratamiento del primer escalón. No se recomienda utilizar dos analgésicos del mismo grupo simultáneamente” [11]. También puede administrarse, en cualquier escalón terapéutico, coadyuvantes que alivian el dolor pero no se consideran analgésicos en sentido estricto, como carbamacepina, gabapentina, amitriptilina, corticoides, benzodiacepinas, etc. Actualmente, la escalera de la OMS sigue vigente, sin embargo, con el paso de los años esta ha sufrido modificaciones.

Tanto para los enfermos, como para sus familiares, el dolor neoplásico merece una especial atención y consideración por parte de los profesionales sanitarios. Es por eso que la atención primaria para enfermos oncológicos debe ir mejorando cada día. El dolor es un síntoma frecuente en estos pacientes y para poder afrontarlo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) fomentó una medida de vital importancia: la facilitación del uso de analgésicos opioides, como la morfina.

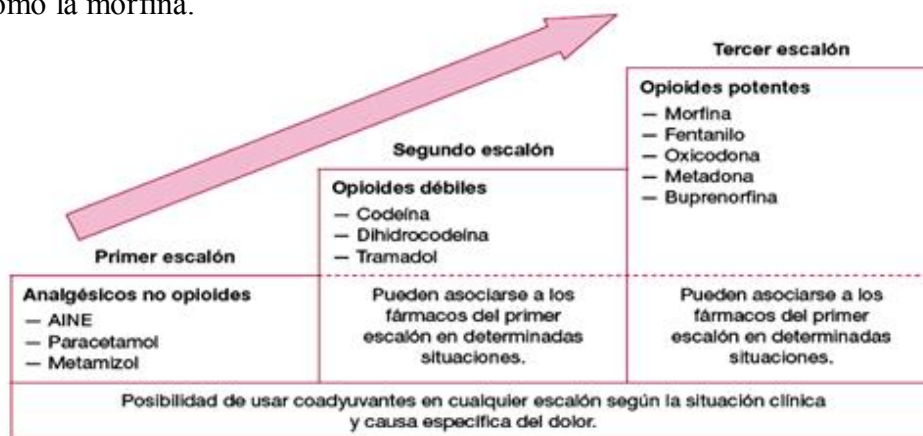


Figura 2. Escalera analgésica de la OMS modificada (L.Cánovas Martínez)

2.5. La morfina

La morfina es un agonista opioide, que como ya hemos mencionado se usa para el tratamiento del dolor severo o dolor crónico. Actualmente el principio activo se comercializa como morfina sulfato pentahidratado o morfina hidrocloreto, en comprimidos o solución inyectable. Dentro de las indicaciones terapéuticas de la morfina, que figuran en su ficha técnica facilitada por la Agencia Española del Medicamento y productos sanitarios (AEMPS), queremos resaltar su indicación para: tratamiento del dolor intenso, tratamiento del dolor post-operatorio inmediato, tratamiento del dolor crónico maligno, entre otros. En cuanto a la forma de administración, esta puede ser subcutánea, intramuscular, intravenosa (inyección lenta o perfusión I.V. continua), intratecal o epidural [12].

Como vemos, es de vital importancia la disponibilidad de opioides y el acceso a ellos, en el tratamiento del dolor oncológico moderado a severo. Sin embargo, hay una serie de prejuicios en relación con la morfina, que conllevan a que no se use, o se use de forma inadecuada e insuficiente. Es poco frecuente que la morfina administrada por vía oral provoque una depresión respiratoria cuando se utiliza de forma paliativa para el dolor neoplásico. Por otro lado, la morfina no se absorbe bien por vía oral (tiene entre el 16% y el 33% de la potencia que se observa cuando se administra por vía intravenosa) es por eso que la dosis se duplican o incluso triplican con respecto a la cantidad que se usaría por vía

parenteral. Esto se debe a que la morfina sufre efecto un efecto de primer paso significativo [13,14].

La dosis y los intervalos de dosificación se deben establecer de forma individual en función de la intensidad del dolor y la respuesta del paciente. Si atendemos a la posología recomendada en su ficha técnica, el uso de morfina no debería ser peligroso.

Tabla 4. Vías de administración de la morfina y dosis correspondientes.

	ADULTOS	NIÑOS
SUBCUTÁNEA O INTRAMUSCULAR	<ul style="list-style-type: none"> • 5-20mg/4h • Generalmente 10 mg iniciales, ajustable según la necesidad y respuesta del paciente 	<ul style="list-style-type: none"> • 0,1 - 0,2 mg/kg/4 horas según necesidades • No superar los 15 mg en 24 horas
INTRAVENOSA	<ul style="list-style-type: none"> • 2,5 - 15 mg diluidos en 4-5 mL de agua estéril para inyección o con solución de NaCl 0,9%, lentamente durante 4-5 minutos. • Perfusión I.V. continua: inicialmente 0,8-10 mg/h, incrementándose en función de la respuesta del paciente. • Dosis altas (275-440 mg/h) durante varias horas o días para el alivio del dolor intenso, si previamente habían sido estabilizados con dosis bajas de morfina. 	<ul style="list-style-type: none"> • 0,05 - 0,1 mg/kg administrados muy lentamente, sin superar los 15 mg en 24 horas. • Pacientes con dolor crónico intenso se recomiendan 0,04- 0,07 mg/kg/h mediante perfusión por vía intravenosa. • Dosis de mantenimiento en dolor crónico: 0,025-1,79 mg/kg/h.

Como cualquier opiáceo, la morfina produce tolerancia, sin embargo cuanto más largo es el tratamiento con dicho principio activo, menos importante es este fenómeno. Se cae entonces, en el error de pensar que a largo plazo la morfina no será efectiva y por tanto se deberá incrementar la dosis. La razón objetiva por la que se incrementa la dosis, radica en que se produce el crecimiento del tumor y con ello, el paciente experimenta mayor dolor [13].

3. ANTECEDENTES

Como se ha mencionado, la morfina es ampliamente utilizada para tratar el dolor severo y crónico (dolor oncológico). Se ha demostrado que, además de sus propiedades analgésicas, la

morfina provoca otros efectos secundarios. Estudios previos han revelado que la morfina es capaz de modificar la progresión del cáncer, ya sea actuando sobre la proliferación o en la apoptosis [15]. Sin embargo, hasta la fecha, los resultados publicados son contradictorios [16], y algunos autores plantean la cuestión de si el receptor opioide μ podría no jugar un papel importante en la regulación mediada por el crecimiento del tumor [15]. Varios estudios indican que el receptor del factor de crecimiento opioide (OGFR) puede estar implicado en la modulación de la progresión tumoral provocada por la morfina [17].

En el año 2013, un grupo de investigación italiano de la Universidad de Siena y Florencia [18] estudió la supervivencia *in vitro* de las células cancerosas en presencia de morfina, mediante el cultivo de la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma humano. Cabe destacar que el neuroblastoma es el tumor extracraneal más común en el infancia. Vieron que en los cultivos celulares utilizados, la morfina produjo un mayor porcentaje de viabilidad en células no diferenciadas y un menor porcentaje, en las diferenciadas, con respecto al control. Estos efectos fueron dependientes de la dosis. Después de la adición de la morfina al medio de cultivo (pasadas 72 h), las células diferenciadas demostraron de forma significativa, una mayor apoptosis (a través de la vía de señalización de la quinasa c-JUN N-terminal y la activación de las caspasas) con respecto al control. Por el contrario, la vía apoptótica no pudo demostrarse en células de neuroblastoma no diferenciadas, ya que en sus experimentos, eran resistentes a la apoptosis inducida por la morfina.

Un año más tarde, investigadores españoles de la Universidad de Salamanca [19] se propusieron encontrar nuevos tratamientos y marcadores moleculares para el diagnóstico y el pronóstico del neuroblastoma, ya que es un cáncer que presenta alta incidencia y alta tasa de mortalidad. Los microRNA constituyen una de esas nuevas estrategias para modular el crecimiento del tumor. Basándose en los estudios antes mencionados, estos investigadores plantearon establecer el efecto de la administración crónica de opiáceos sobre la proliferación celular en células no diferenciadas de la línea SH-SY5Y de neuroblastoma. Para ello, incubaron las células SH-SY5Y con diferentes dosis de morfina y observaron que dosis bajas de morfina (10 nM) promovían la proliferación celular en células no diferenciadas y reducía los niveles de expresión de miR133b, mientras que las dosis más altas (1 μ M) inhibían la proliferación celular y se relacionaba con la disminución de los niveles de miR133b y miR128 sin desencadenar la apoptosis. Las publicaciones de estos grupos de investigación fueron nuestro punto de partida para desarrollar el presente trabajo.

4. OBJETIVOS

En el trabajo descrito en esta Memoria de Fin de Grado se pretende contribuir con el conocimiento de los efectos de la morfina, en relación con el cáncer. El objetivo principal del presente trabajo es realizar las tareas necesarias, mediante revisión bibliográfica y trabajo de investigación, para evaluar un sistema que revierta estos efectos adversos de la morfina en el tratamiento del dolor en pacientes con cáncer. Para ello se investigará el efecto de un antagonista opioide: naloxona. En caso de encontrar resultados positivos (reversión del efecto proliferativo celular de la morfina) se propone, como innovación tecnológica de interés terapéutico, el uso de naloxona incluida en un sistema de liberación modificada (micropartículas poliméricas), dadas sus características biofarmacéuticas y farmacocinéticas (baja biodisponibilidad por vía oral y corta semivida plasmática). Teniendo en cuenta, los estudios previos, se realizarán ensayos experimentales con el objetivo de ver la reproducibilidad de los resultados de algunos investigadores, y también será necesario adquirir conocimientos referentes al cultivo celular (tanto teóricos como prácticos), así como del uso de los equipos de medida de absorbancia.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Sustancias empleadas

La morfina fue proporcionada por Braun (caducidad 2017) y el hidrocloreuro de naloxona dihidrato (N7758) por Sigma. Además se utilizaron: Penicilia/Estreptomicina (P0781 Sigma), Suero bovino fetal (F7524 Sigma), Dimetil sulfoxido (D8418 Sigma), Tiazolilo azul tetrazolio o MTT (M2128 Sigma), Bicarbonato sódico (141638 Panreac), ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico o HEPES (H3375 Sigma), Tripsina-EDTA 0,25% (2500072 Gibco), Nutriente Ham F-12, Medio de Cultivo Eagle Modificado de Dulbecco o DMEM (D56481 Sigma).

5.2. Línea celular y condiciones de cultivo

Las células SH-SY5Y de neuroblastoma (procedentes de la empresa NOVARTIS) se cultivan en flask de 75 cm², con un medio base constituido por DMEM y nutriente F-12 Ham, en una proporción 1:1. E incubadas a 37° C y 5% de CO₂.

En nuestro caso, se prepara un total de 500 mL, para los cuales se necesita:

- a) DMEM (250 mL): 0,55 g HCO_3^- , 0,59 g HEPES y 3,35 g DMEM (13,4 g/L según la casa comercial).
- b) F-12 Ham (250 mL): 1,25 g HCO_3^- y 2,7 g F-12 (11,1 g/L según la casa comercial).

Posteriormente, se adiciona 50 mL o 5 mL de SBF, para obtener un medio 10% y 1%, respectivamente. Luego se realiza un filtrado y por último se le añade penicilina/estreptomicina, con una relación de 5 mL/L.

El protocolo que se realiza es:

- **Día 1: Pase de células y siembra en placa**

El área de trabajo es la campana de flujo laminar que nos asegura la condición de esterilidad necesaria para estas células, además se usan guantes de látex desinfectados previamente con alcohol. El primer paso es extraer un volumen de 9 mL del contenido del flask con una pipeta y se deposita en un tubo estéril. El volumen restante del flask se desecha e inmediatamente se añade 1 mL de tripsina. El flask se somete a pequeños golpes para ayudar a que las células se despeguen. Para comprobar si esto ha ocurrido, se observa mediante un microscopio invertido que las células adquieren forma redondeada. Posteriormente, se añade el líquido del tubo reservado al flask, haciendo especial hincapié en recoger todas las células del recipiente. Retiramos todo el contenido y se deposita nuevamente en el tubo para su posterior centrifugación a 750 rpm durante 10 minutos. Se decanta el contenido total del tubo, quedando las células sedimentadas en el fondo del tubo. Debemos proceder al recuento de dichas células, para ello usaremos la “Cámara de Neubauer” (Figura 3).

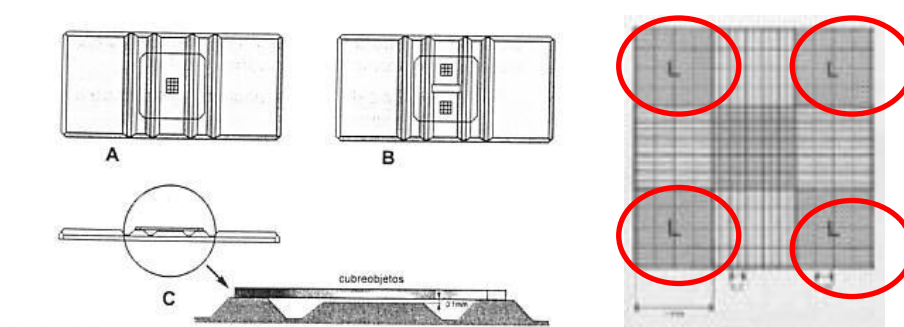


Figura 3. Cámara de Neubauer y retícula con cuadrantes de conteo

Previamente se hace una dilución 1:10 de las células y se introduce, por capilaridad entre la cámara y el cubre. Se observa la retícula al microscopio con el aumento

adecuado y se cuentan las células en los cuadrantes señalados. El cálculo de la concentración de células se realiza mediante la fórmula:

$$N^{\circ} \text{ células (media de los cuadrantes contados)} \times 10^4 \text{ (factor de la cámara Neubauer)} \times \text{factor de dilución} \times \text{volumen de la suspensión}$$

Una vez obtenida la concentración de células, éstas se resuspenden en medio SBF 10% y se siembra en placa de MTT (en este caso sembramos 10^5 células/pocillo) y se incuba 24 h a 37°C .

• Día 2: Incubación con morfina y Naloxona

Para determinar si la morfina puede alterar la proliferación en un neuroblastoma modelo, la línea de células SH-SY5Y se incuba con diferentes dosis de morfina, para así establecer una curva de concentraciones y saber cuál es intervalo idóneo para ensayar. Una vez hecho esto, se preparan las soluciones de morfina y naloxona (Figura 4). Cabe destacar que para preparar las soluciones ya no se utiliza SBF 10 %, sino SBF al 1%.

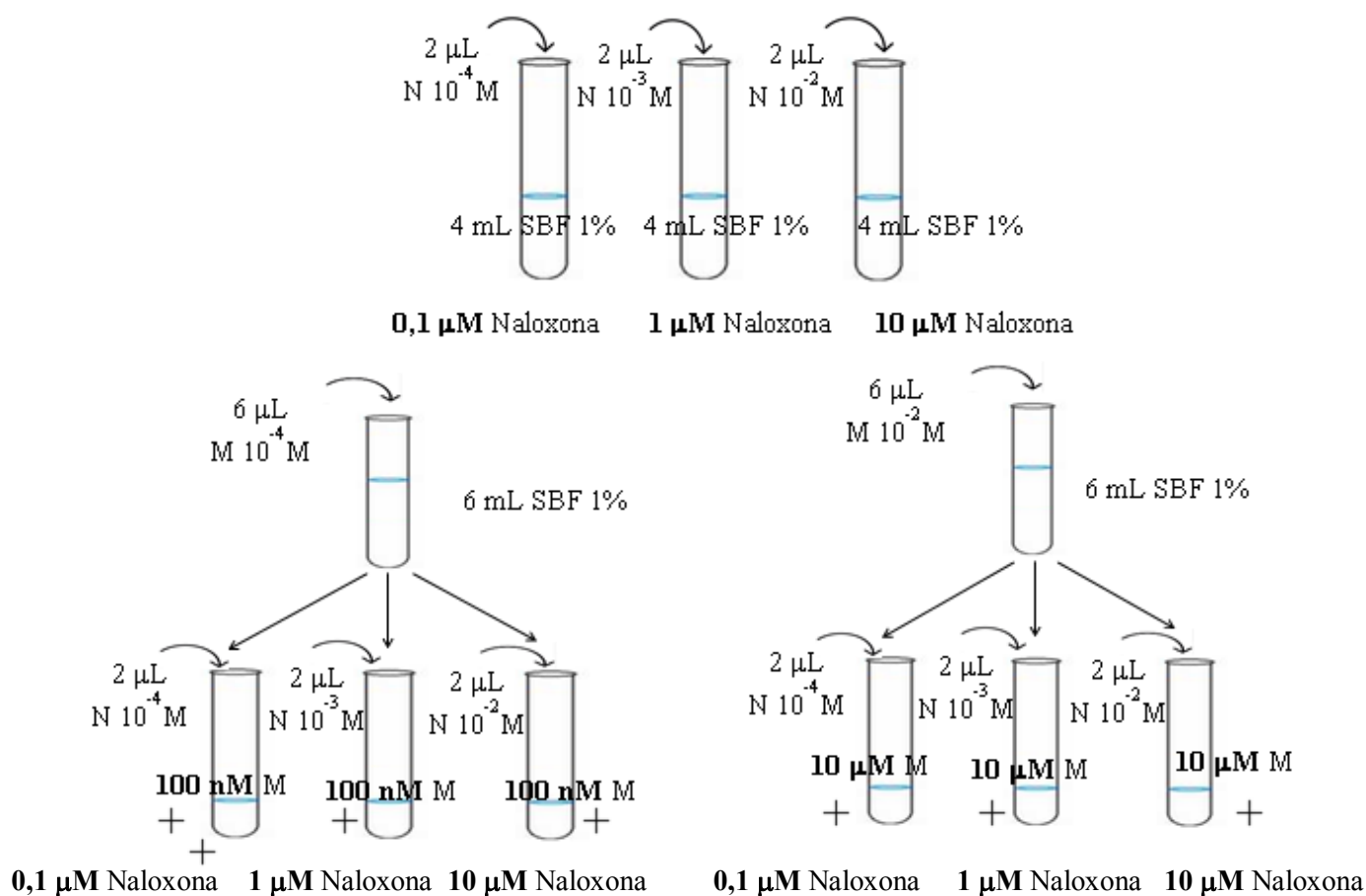


Figura 4. Preparación de soluciones de morfina y naloxona

Después todas estas soluciones son filtradas y pasadas a tubos estériles. A continuación, se retira la placa de la incubadora con mucho cuidado, recordando desinfectarse las manos antes. Comprobamos, con el microscopio invertido, que las células han crecido lo suficiente (Figura 5) para poder proseguir con el experimento. Cada concentración se realiza por triplicado (3 pocillos, cada uno con 500 μ L de solución).

Los pocillos correspondientes al control únicamente contienen SBF 1% (sin fármaco), mientras que las tres soluciones de naloxona se añaden a sus correspondientes filas y además a las correspondientes a la morfina-naloxona. Esto último se realiza porque previamente se incuban 1 h con dicha sustancia antes de ser sustituida por las soluciones de morfina-naloxona. Para finalizar, rotulamos la placa y se incuba a 37°C, 24 h, para su posterior medida.

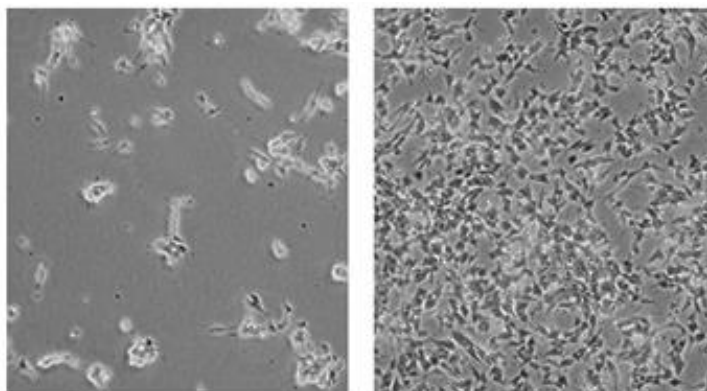


Figura 5: Células SH-SY5Y poco crecidas (izquierda) y crecidas (derecha)

5.3. Ensayo de MTT

El ensayo de MTT está basado en la reducción de una sal de tetrazolio (MTT) soluble y de color amarillo, a un formazán insoluble de color azul. Esta reacción se realiza en el interior de las células por acción de una enzima mitocondrial (succinato-deshidrogenasa) y por lo tanto, sólo ocurre cuando las células son viables (Figura 6). Cuanto mayor es la intensidad de color, habrá mayor cantidad de células viables (Figura 7). Para la preparación del reactivo, se realiza una solución de concentración 5 mg/mL de MTT, en PBS o Krebs, y posteriormente esta se esteriliza pasándose por un filtro 0,22 μ m. La alícuota se congela después de su uso y debido a que dicho reactivo es fotosensible se debe trabajar en oscuridad.

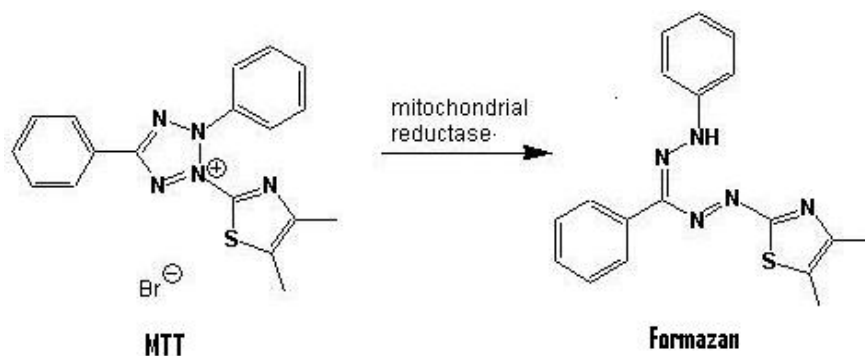


Figura 6. Reducción de la sal de tetrazolio por acción de una reductasa mitocondrial [20]

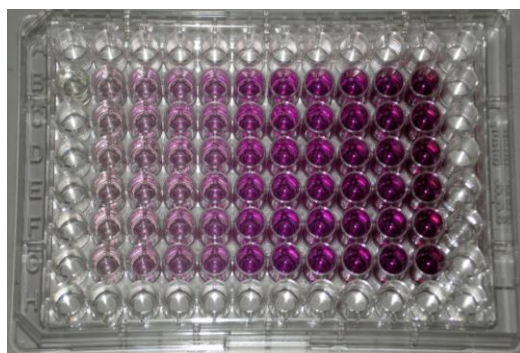


Figura 7. Microplaca de MTT

De forma protocolaria, la MTT se añade en una proporción de 1 μL por cada 10 μL de medio. En nuestro caso (**Día 3**), fueron añadidos 50 μL de MTT en cada pocillo que contiene 500 μL de volumen. Posteriormente, se incubó la placa a 37°C, aproximadamente 2h. Transcurrido ese tiempo, se observa la formación de un precipitado azul en los pocillos. Para solubilizar el precipitado formado, se añade 500 μL de Dimetil sulfóxido (DMSO) y se deja 10 minutos en agitación.



Figura 8. Equipo de FLUOstar OPTIMA

Trás los cuales se pasan las muestras a la microplaca para su lectura. Todas las medidas son realizadas en el equipo de FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH), que es un lector de microplacas versátil que tiene varios modos de detección (Figura 8). Este equipo mide absorbancia, luminiscencia y fluorescencia. Para el presente trabajo se realizan medidas de absorbancia a una longitud de onda de 562 nm, sin blanco.

5.4. Análisis estadístico

El programa GraphPad Prism, es un programa que se utiliza para procesar datos estadístico y realizar gráficas. Con este programa se puede realizar diferentes tipos de análisis, como el test **ANOVA** (Analysis of Variance) y el post-test **Dunnett**.

ANOVA es un nombre genérico y se usa para una variedad inmensa de modelos de comparación de medias, también conocido como diseño de experimentos. La ANOVA simple también llamada One-way ANOVA compara las medias de tres o más grupos incomparables, para ver si existen diferencias significativas entre ellas. Este test asume que las muestras siguen una distribución de Gauss. Si bien esta suposición no es demasiado importante con muestras grandes, es importante con tamaños de muestra pequeños.

El test de Dunnett sólo se utiliza como prueba de seguimiento a ANOVA. Esta compara cada una de las medias calculadas, con la media del control, teniendo en cuenta la dispersión de todos los grupos. Por ejemplo, cuando se compara la media de A con la C el test compara la diferencia entre las medias de la cantidad de la dispersión, cuantifica usando la información de todos los grupos, y no sólo a los grupos A y C. Esto aporta más capacidad para detectar diferencias, y sólo tiene sentido cuando se acepta el supuesto de que todos los datos tienen la misma desviación estándar, incluso si las medias son diferentes. Los resultados son un conjunto de decisiones: "estadísticamente significativo" o "no es estadísticamente significativo". Este test puede calcular un intervalo de confianza de la diferencia entre los dos medias. Si se elige un intervalo del 95%, entonces podemos estar 95% seguros de que todos los intervalos contienen el valor real de la población [21].

6. RESULTADOS

Las medias de los resultados obtenidos tras la lectura de la microplaca en el equipo FLUOstar, fueron introducidas en el programa GraphPad Prism, y se analizaron estadísticamente mediante el test ANOVA y el post-test Dunnett. Los datos obtenidos de los tratamientos con fármacos se compararon con los datos de los controles no tratados, obteniéndose tres gráficas. La Figura 9 corresponde a la curva de concentraciones, en la cual se representa el porcentaje de viabilidad celular frente a diferentes concentraciones de morfina. Se obtuvieron dos gráficas que corresponden al efecto del antagonista opioide naloxona 10 μ M sobre la proliferación celular, sola y en incubación simultánea con morfina 100 nM (Figura 10) y con morfina 10 μ M (Figura 11); en las cuales se representa el porcentaje de viabilidad celular frente a las concentraciones de los fármacos

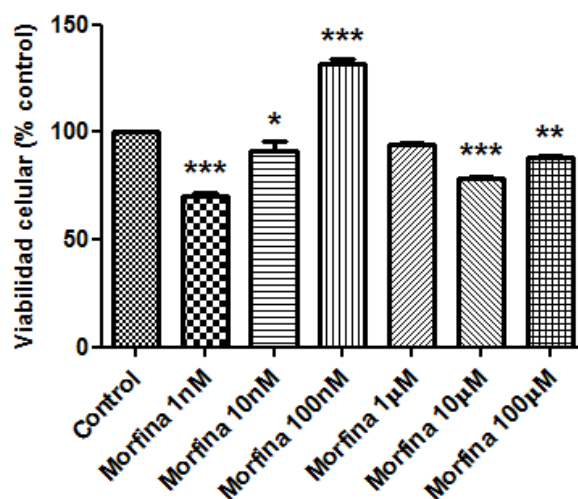


Figura 9. Análisis del efecto de la morfina sobre células SH-SY5Y no diferenciadas. El límite de significancia fue tomado cuando el valor de (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ y (***) $p < 0,001$, de la morfina frente al control.

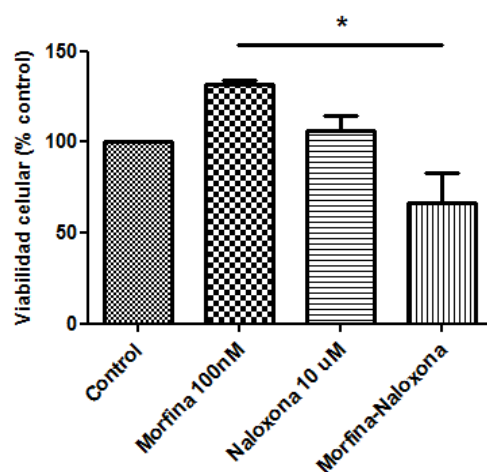


Figura 10. Análisis del efecto de la naloxona, sola y en sobre células SH-SY5Y no diferenciadas. El límite de significancia fue tomado cuando el valor de $p < 0,05$.

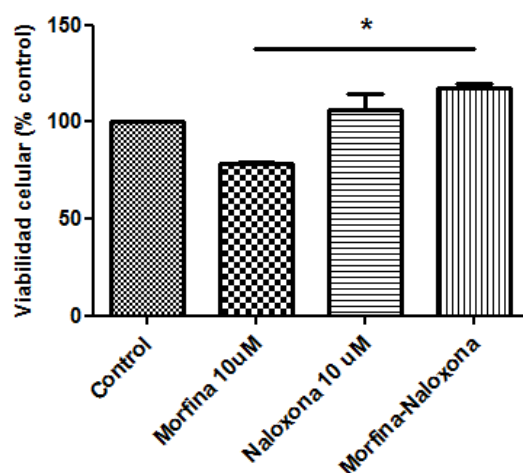


Figura 11. Similar análisis del efecto de la naloxona sobre células SH-SY5Y no diferenciadas con una variación de la concentración de morfina (10 µM) con la que se incubó.

7. DISCUSIÓN

Se discute a continuación el alcance de los resultados expuestos anteriormente. Se sabe que la administración de la morfina en pacientes oncológicos puede alterar el crecimiento del tumor. Sin embargo, las evidencias muestran resultados confusos, esto puede deberse a diferentes factores. En este estudio hemos analizado el efecto de dos dosis diferentes de morfina, 100 nM y 10 μ M, y si el resultado de este efecto puede ser bloqueado por un antagonista opioide (naloxona) cuando se usa a la misma concentración que la morfina o a una concentración superior. Nuestros resultados indican que hay una tendencia dosis-dependiente de los efectos de la morfina, ya que la dosis baja de morfina (100 nM) promueve la proliferación celular y además es el punto máximo que expresa el mayor porcentaje de viabilidad celular en la curva de concentraciones, y por otro lado, la dosis de morfina de 1 μ M inhibe la proliferación. Ambos resultados son estadísticamente significativos (límite de significancia tomado cuando el valor de $p < 0,001$), como se muestra en la Figura 9, lo que apoyaría nuestro estudio y además corroboraría la investigación hecha por la Universidad de Salamanca [19]. No concordando con los estudios realizados por el grupo italiano [18].

También se observó que cuando se incuban las células SH-SY5Y, únicamente con naloxona 10 μ M, ésta no tuvo ningún efecto sobre la proliferación celular (Figuras 10 y 11), sin embargo, si se incubaba simultáneamente con morfina se conseguía revertir o bloquear su efecto: la naloxona incubada con morfina 100 nM, disminuía el porcentaje de células viables con respecto al control (Figura 10), al contrario que la naloxona incubada con morfina 10 μ M, que aumentaba levemente el porcentaje de células viables con respecto al control (Figura 11). Aunque estos últimos resultados no coinciden con la investigación del grupo español [19].

Sin embargo, no se pueden extraer conclusiones acerca del efecto de la morfina sobre la apoptosis ya que el parámetro evaluado en el presente trabajo, fue la viabilidad celular.

8. CONCLUSIONES

A través de la revisión bibliográfica del presente trabajo, se ha conseguido interrelacionar los conocimientos adquiridos durante todos los años de carrera, tanto de Tecnología Farmacéutica, como de Salud Pública, Biología Molecular, Bioquímica Clínica, Estadística, etc., aplicados al tema del cáncer. Se ha podido entender que el cáncer es un problema de primera instancia ya que tiene una elevada incidencia y prevalencia no sólo en España, sino a nivel mundial, y por ello se debe seguir innovando en su investigación. Además, se ha visto la

gran importancia que tiene el tratamiento paliativo en el tema del dolor severo y oncológico, siendo necesario para ayudar a mejorar la calidad de vida del paciente. El acceso a numerosas bases de datos (PubMed, ScienceDirect, etc.) para recopilar referencias bibliográficas, ayudaron a comprender y entender los resultados obtenidos.

A través del trabajo de investigación se ha comprendido la dificultad del cultivo in vitro de las células SH-SY5Y debido a su gran sensibilidad, así como los problemas que conlleva trabajar en un laboratorio intentando maximizar las condiciones de esterilidad. Se han adquirido importantes conocimientos acerca del manejo de equipos de medida que pueden servirnos para futuras investigaciones. Para finalizar, se han observado que nuestros resultados aportan novedades en cuanto a la generación de un modelo sistemático experimental que nos permite entender el comportamiento dosis-dependiente de la morfina y la utilidad de naloxona para revertir su efecto adverso. Esto ha sido esencial para poder diseñar, en un futuro, el sistema de liberación modificada, mediante el uso de micropartículas que contengan naloxona, las cuales podrían ser insertadas aprovechando la extirpación quirúrgica del tumor y/o inyectadas.

9. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Ministerio de Sanidad y Consumo, Dirección General de Planificación Sanitaria. “La situación del cáncer en España” <http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/enfLesiones/enfNoTransmisibles/docs/situacionCancer.pdf> (último acceso 19/12/2016).
- 2 Muñoz, A. “Cáncer: genes y nuevas terapias” Editorial Hélice. España 1997.
- 3 Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) <http://www.seom.org/es/prensa/el-cancer-en-espanyacom/105460-el-cancer-en-espana-2016> (último acceso 19/12/2016).
- 4 GLOBOCAN 2012 <http://globocan.iarc.fr> (último acceso 26/01/2017).
- 5 Organización Mundial de la Salud (OMS). Nota descriptiva nº 297. Febrero 2015 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/> (último acceso 20/01/2017).
- 6 Porta Sales, J. “Dolor oncológico” Arán Ediciones. 2009. Capítulo 2 Pág 22.
- 7 Gonzalez Barón, M. “Tratado de medicina paliativa y tratamiento de soporte del paciente con cáncer” Ed. Médica Panamericana. 2º Edición.2007. Capítulo 1. Pág 1-9.
- 8 Loeser JD, Treede RD The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. Pain 2008, 137:473-477.

- 9 OMS <http://www.who.int/cancer/palliative/painladder/en/> (último acceso 26/01/2017).
- 10 Cleeland CS, Gonin R, Hatfield A, Edmonson MD, Blum RH, Stewart JA. Pain and its treatment in outpatients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 1994;330:592-6.
- 11 OMS, Cancer Pain Relief. Geneva, 1996. 2º Edición, 1996. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/37896/1/9241544821.pdf> (último acceso 28/01/2017).
- 12 Centro de Información Online de Medicamentos de la AEMPS (CIMA), Ficha técnica de la morfina http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/42592/FT_42592.pdf (último acceso 18/01/2017).
- 13 Sociedad Española de cuidados paliativos (SECPAL) <http://www.secpal.com/6-prejuicios-sobre-el-uso-de-la-morfina> (último acceso 23/01/2017).
- 14 Vademecum en IQB <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/m061.htm> (último acceso 29/01/2017).
- 15 Rasmussen, M., Zhu, W., Tonnesen, J., Cadet, P., Tonnesen, E. y Stefano, G.(2002) Effects of morphine on tumour growth, *Neuro Endocrinol. Lett.* 23, 193–198.
- 16 Gach,K., Wyrebska, A.,Fichna,J. y Janecka, A. (2011) The role of morphine in regulation of cancer cell growth, *Naunyn Schmiedeberts Arch. Pharmacol.* 384, 221–230.
- 17 Schäfer, M. y Mousa, S. (2009) Opioid therapy and tumor progression, *Adv. Palliat. Med.* 8, 53-56.
- 18 Fiorea, G., Ghelardinib, C., Brunia, G., Guarnac, M. y Bianchic, E. (2013) Differentiation state affects morphine induced cell regulation in neuroblastoma cultured cells, *Neuroscience* 555, 51-56.
- 19 Gonzalez-Nuneza, V., Noriega-Prieto, J. y Rodríguez, R. (2014) Morphine modulates cell proliferation through mir133b & mir128 in the neuroblastoma SH-SY5Y cell line, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1842, 566–572.
- 20 Brescia, P. y Banks, P. “Quantifying Cytotoxicity of Thiostrepton on Mesothelioma Cells using MTT Assay and the Epoch Microplate Spectrophotometer” <http://www.biotek.es/es/resources/articles/quontification-cell-viability-epoch.html> (último acceso 06/02/2017).
- 21 Graph Pad Software, GraphPad Statistics Guide http://www.graphpad.com/guides/prism/6/statistics/index.htm?f_ratio_and_anova_table%28one-way_anova%29.htm (último acceso 06/02/2017).